



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07K 16/08, C12N 5/20, 15/06, 15/64, 15/86, C12P 21/08, G01N 33/569, 33/577 // (C12P 21/08, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO96/29349 (43) 国際公開日 1996年9月26日 (26.09.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00655 (22) 国際出願日 1996年3月15日 (15.03.96) (30) 優先権データ 特願平7/59149 1995年3月17日 (17.03.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.)[JP/JP] 〒841 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地 Saga, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 島田 隆(SHIMADA, Takashi)[JP/JP] 〒113 東京都文京区弥生1-5-8 203号 Tokyo, (JP) 隈 秀和(KUMA, Hidekazu)[JP/JP] 鈴木要介(SUZUKI, Yousuke)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市観音台1-25-11 久光製薬株式会社 筑波研究所内 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 湯浅恭三、外(YUASA, Kyoze et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFICALLY RECOGNIZING ADENO-ASSOCIATED VIRUS CAP PROTEIN		
(54) 発明の名称 アデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体		
(57) Abstract A monoclonal antibody specifically recognizing the adeno-associated virus CAP protein and produced by hybridomas which have been formed through fusion between lymphocytes prepared from a mammal immunized with the adeno-associated virus CAP protein or a recombinant of the protein as an antigen and a myeloma cell line. Because of being a novel antibody and capable of specifically recognizing the adeno-associated virus CAP protein, the antibody is applicable to the detection of the adeno-associated virus and the purification of an adeno-associated virus vector for gene therapy.		

(57) 要約

抗原としてアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質またはアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質の組換え体で免疫した哺乳動物より調製したリンパ球と、ミエローマ細胞株とを融合したハイブリドーマから産生されてなることを特徴とするアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体。

本発明のモノクローナル抗体は新規な抗体であり、またアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識できるため、アデノ随伴ウイルスの検出および遺伝子治療用アデノ随伴ウイルスベクターの精製への応用が可能である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LR	レソト	PR	プエルトリコ
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	RU	ロシア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バハマ	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GE	ジョージア	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MC	モナコ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GU	グアム	MG	マダガスカル	TD	チャド
CC	中央アジア共和国	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
CG	コンゴ	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CH	スイス	IT	イタリア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CI	コートジボワール	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CM	カメルーン	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CN	中国	KR	大韓民国	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CV	カボベルデ			NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
				NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
						VN	ベトナム

明 細 書

アデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体

技術分野

- 本発明は、新規なモノクローナル抗体に関する。さらに詳しくは、本発明は、
- 5 アデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、並びに、上記のモノクローナル抗体を利用するアデノ随伴ウイルスの検出方法および遺伝子治療用ウイルスベクターの精製方法に関する。

背景技術

- 10 遺伝子治療のための遺伝子導入法としては、これまで多くの方法が試みられてきたが、その高い遺伝子導入効率から、現在ではウイルスベクターによる方法が主流になってきている。例えば、レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターについての開発が進んできているが、これらのベクターは、導入遺伝子の発現効率が低い、染色体への組み込みがうまくいかない、あるいは細胞毒性がある
- 15 等という諸問題が報告されている。

- 最近注目されているウイルスベクターの一つにアデノ随伴ウイルス(AAV)がある。AAVはアデノサテライトウイルスとも称され、動物ウイルスの中で最も小さいパルボウイルスB属に分類される粒子の一つである。このウイルスは自己増殖能の欠けている欠損性ウイルスであり、その増殖はアデノウイルスに依存
- 20 することが知られている。即ち、アデノ随伴ウイルスは、二本鎖DNAウイルスとは異なってキャプシドタンパク質しかコードしていないことを特徴とする、一本鎖DNAウイルスであり、それ自身の転写と複製は細胞の系に依存しているために、アデノウイルスに感染している細胞でしか増殖できないのである。

- また、AAVは、ヒト第19染色体の長腕の特定の領域に特定的に組み込まれ
- 25 易いことも報告されているため特に注目されている。

上記したようにアデノ随伴ウイルスはアデノウイルスが感染した細胞でなけれ

- ば複製され得ないことから、遺伝子治療用のウイルスベクターとしてAAVベクターを使用することを意図する場合には、AAVベクターを精製する必要が生じてくることになる。即ち、一般的なAAVベクターの調製法では、野生型AAV遺伝子からITR (inverted terminal repeat) を除去したパッケージングプラスミドとIDRとを導入した遺伝子を含むベクタープラスミドをHeLa細胞のような適当な細胞にコトランスフェクションすると同時にアデノウイルスを感染させた後、凍結融解を繰り返すことにより産出したウイルスベクターを得ることができる。この際、組換えAAVと同時にアデノウイルスも産出されてくるので、組換えAAVのみを精製するための方法の開発が望まれている。そのための一手段として、AAVに特異的なモノクローナル抗体を使用して精製することが考えられるが、現在までの所、AAVに特異的なモノクローナル抗体は得られていない。

発明の開示

- 即ち、本発明の目的の一つは、アデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を開発することである。また、本発明の別の目的は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、並びに、上記のモノクローナル抗体を利用するアデノ随伴ウイルスの検出方法およびウイルスベクターの精製方法を提供することである。

- 本発明は、抗原としてアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質またはこの組換え体を免疫した哺乳動物より調製したリンパ球と、ミエローマ細胞株とを融合したハイブリドーマから産生されてなることを特徴とするアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。

- 更に本発明は、上記のアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体の産生能を有するハイブリドーマ細胞株を提供する。
- 更に本発明は、上記アデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を利用することを特徴とする、アデノ随伴ウイルスの検出方法および遺伝子治療用組換えアデノ随伴ウイルスベクターの精製方法をも提供する。

図面の簡単な説明

図1は、各モノクローナル抗体（1E7、1E9、1G5および1G12）の抗原に対する反応性を示すグラフである。

図2は、各モノクローナル抗体（2H7、2H9および3E7）、および対照
5 のP3U1培養上清の抗原に対する反応性を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳しく説明する。本発明のモノクローナル抗体の代表的な製造法としては、例えば、下記の方法が挙げられる。

10 先ず、抗原であるアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質の組換え体で、被免疫動物を免疫し、次いで該抗原を追加免疫し、その動物から抗体産生細胞を分離する。次いで、上記の抗体産生細胞をミエローマ（骨髓腫）細胞と融合させてハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマより所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングによって単離した後、この選択されたハイブリドーマを培養することによって産生するモノクローナル抗体を得ることができ
15 る。

本発明のモノクローナル抗体の作製において使用される抗原としては、アデノ随伴ウイルスCAPタンパク質またはアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質の組換え体を使用できる。即ち、宿主細胞に感染して増殖したウイルス粒子を回収してCAPタンパク質を精製して用いてもよいし、当業者によく知られている遺伝
20 子組換え技術（即ち、CAPタンパク質をコードするDNAの単離およびクローニング、当該DNAと好適な発現ベクターによる発現用プラスミドの構築、当該プラスミドの宿主への形質転換、並びに形質転換体の適当な条件下での培養、という各操作を含む）を使用して生産されたアデノ随伴タンパク質の組換え体を使用してもよい。

25 上記のモノクローナル抗体の製造方法において、抗原を免疫する被免疫動物としては一般に用いられる各種の被免疫動物を何等支障なく用いることができる。被免疫動物の具体的な例示としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、

ウシ、ウマ等の哺乳動物を挙げることができる。そのうち、該免疫によって得られた抗体産生細胞（リンパ球）と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点から、マウスおよびラットの中から被免疫動物を選ぶことが好ましい。

- かかるマウスおよびラットの系統は特に制限されるものではなく、例えば、マウスの系統としては、各系統、例えばA、AKR、BALB/c、BDP、CB A、CE、C3H、C57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、RIII、SJL、SWR、WB、129等が挙げられる。また、ラットの系統としては、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer等が挙げられる。このうち後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスではBALB/c系統、ラットではLow系統が特に好ましい被免疫動物である。また、免疫時のマウスおよびラットの週齢は、好ましくは、5～12週齢、更に好ましくは、6～8週齢である。5週齢より早いと免疫が困難であり、12週齢より遅いと免疫効率が低下する傾向があるからである。
- また、抗原であるアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質の組換え体を被免疫動物に免疫する方法としては、それ自体既知の免疫法を支障なく用いることができる。例えば、Weir, D. M. : Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987) Kabat, E. A. およびMayer, M. M. : Experimental Immunochimistry, Charles C. Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964)等に詳しく掲載されている方法を用いることができる。かかる免疫法のうち、本発明において好適な免疫法を、以下に具体的に示す。
- (1) アデノ随伴ウイルスCAPタンパク質に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株の作製

抗原の投与方法としては皮内投与または腹腔内投与どちらでも可能である。しかし、免疫効率を高めるために両者の併用が好ましく、前半は皮内投与し、後半または最終回のみ腹腔内投与すると、特に免疫効率を高めることができる。

免疫スケジュールは、被免疫動物の種類、個体差等により異なり一概に決定できないが、一般的には、抗原投与回数3～6回、投与間隔2～6週間が好ましく、投与回数3～4回、投与間隔2～4週間が更に好ましい。投与回数を過度に増やし過ぎると抗原を浪費するため好ましくなく、また投与間隔を広げすぎると被免疫動物の老齢化、ひいては細胞の低活性化を招くために好ましくない。

また、抗原の被免疫動物への免疫量は、被免疫動物の種類、個体差等により異なるため一概に決定できないが、一般的には5～500 μ g、好ましくは10～100 μ gの範囲内が好適である。追加免疫のスケジュールとしては抗原の被免疫動物への最終の免疫後、1～6週間、好ましくは2～4週間、更に好ましくは2～3週間経過した後に追加免疫を行なうことが好ましい。その後、1から10日後、好ましくは2から5日後、更に好ましくは2から3日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞を取り出すことが好ましい。追加免疫の時期が免疫後6週目より遅すぎたり、1週目より早すぎると追加免疫の効果が少なくなるため好ましくなく、また、脾臓細胞を取り出す時期が追加免疫から1日未満であると追加免疫の効果が少なくなり好ましくない。

上記の追加免疫を行なう際の抗原量は被免疫動物の種類、大きさ等によって異なるため一概には決定できないが、マウスの場合は一般的には5～500 μ g、好ましくは10～100 μ g、更に好ましくは10～50 μ gの範囲内が好適である。不必要に大量の抗原投与は免疫効果を低下させるだけでなく、被免疫動物にとっても好ましいものではない。

上記の被免疫動物より無菌的に取り出された脾臓細胞から抗体産生細胞を分離する方法としてはそれ自体既知の方法が特に制限なく採用される (Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975), Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6, 511 (1977), Milstein et al., Nature, 266, 550, (1977), Walsh, Nature, 226, 495, (1977) を参照)。上記脾臓細胞を細切し、ステンレスメッシュで濾過した後、イーグル最小必須培地 (MEM) に浮遊させて分離する方法を一般的な方法として用いることができる。

次いで、こうして得られた抗体産生細胞は、モノクローナル抗体を得るために、

ミエローマ細胞と細胞融合してハイブリドーマとされる。

ハイブリドーマを作製する際に抗体産生細胞と融合されるミエローマ細胞の種類は、特に制限されるものではなく、従来から細胞融合に際して通常用いられているそれ自体既知のミエローマ細胞株から選択することができ、かかるミエローマ細胞の具体例としては、例えばマウス由来のミエローマ細胞またはヒト由来のミエローマ細胞などが挙げられる。これらの細胞株を具体的に例示すると、マウス由来の X63-Ag8 (X63)、NS1-Ag4/1 (NS1)、P3X63-Ag8. U1 (P3U1)、X63-Ag8. 654 (X63. 654)、SP2/0-Ag14 (SP2/0)、MPC11-45. 6TG1. 7 (45. 6TG)、F0、S149/5XX0、BU. 1、等；ラット由来の 2. 0. RSY3. Ag1. 2. 3 (Y3)、等；ヒト由来の U-226AR (SKO-007)、GM1500. GTG-A12 (GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2 (HMy2)、8226AR/NIP4-1 (NIP41) 等（ただし、括弧内は略号を示す）が挙げられる。上記のミエローマ細胞株は、細胞融合後のハイブリドーマを選択する手法が確立されている HGPRT (ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ) 欠損株であることが好ましい。上記で例示されている細胞株は、すべて HGPRT 欠損株である。

本発明のモノクローナル抗体の製造方法において、前記の抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合方法は、それ自体既知の方法、例えばポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電氣的刺激を利用する物理的方法（エレクトロポレーション）などを用いることができ、細胞の生存率を強く低下させない程度の条件下で適宜実施することができる（例えば、Weir, D. M. : Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. および Mayer, M. M. : Experimental Immunochimistry, Charles C. Thomas Publisher Springfield, Illinois (1

964) 参照)。

上記の化学的方法をより具体的に示せば、高濃度ポリマー溶液としてポリエチレングリコールを用いる場合、分子量1500～6000、好ましくは2000～4000のポリエチレングリコール中で、30～40℃、好ましくは35～36℃の温度で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを1～10分間、好ましくは5～8分間インキュベートする方法が一般的である。

上記細胞融合により得られるハイブリドーマの選択方法は特に制限はないが、通常HAT（ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン）選択法が用いられる。HAT選択法の詳細については、例えば、Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975), Milstein et al., Nature, 266, 550, (1977)に記載されている。

この方法は、アミノプテリンで生存し得ないHGPRT欠損株のミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを得る場合に有効である。すなわち、前記細胞融合によって得られたハイブリドーマをHAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地）で培養を続けることにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせたハイブリドーマのみを選択的に残存させ、かつ増殖せしめることができる。

また、上記ハイブリドーマのクローニング法としては、例えばメチルセルローズ法、軟アガロース法、限界希釈法等の既知の方法を特に制限なく採用できる
[例えばBarbara, B. M. およびStanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. FreemanおよびCompany, San Francisco (1980) 参照]。これらの方法のうち、特に限界希釈法が好適である。限界希釈法においては、先ずマイクロプレート上に、ラット胎児由来繊維芽細胞株、正常マウス脾臓細胞、胸腺細胞または腹水細胞などのフィーダー細胞を接種しておく。一方、あらかじめハイブリドーマを培地で0.2～0.5個/0.2mlになるように希釈しておき、この希釈したハイブリドーマの浮遊液を各ウェルに0.1mlずつ入れる。一定期間毎に例えば3日毎に約1/3の培地を新しいものに交換する。そして2週間程度培養を続けると、ハイブリドーマのクローンが

増殖してくる。

このようにして選択されたハイブリドーマは、これを培養することにより、モノクローナル抗体を効率よく産生することができるが、培養に先立ち、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることが望ましい。このスクリーニングにはそれ自体既知の方法が採用できる。例えば、固相EIA (Enzyme Immunoassay) 法、液相EIA法、固相RIA (Radio Immunoassay) 法、液相RIA法、蛍光抗体法等が挙げられるが、本発明では、固相EIA法を用いることが好ましい。固相EIA法では、マイクロプレートの各ウェルに、アデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を固定化した後、抗体を含むハイブリドーマ培養液の上清を加え、抗原-抗体反応を行なわせ、その後、ウェルを洗浄し、ペルオキシダーゼ標識マウスIgG抗体等の標識抗体を加える。更に洗浄後、基質の過酸化水素と発色剤を加え、吸光度を測定し、活性を測定する。この方法により、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることができる。かかるスクリーニングは、上記のようにハイブリドーマをクローニングした後で行なってもよいし、その前に行なってもよい。

(2) アデノ随伴ウイルスCAPタンパク質に対するモノクローナル抗体の製造ならびに精製方法

本発明のモノクローナル抗体の製造方法において、ハイブリドーマの培養方法は特に制限されるものではなく、通常のハイブリドーマの培養と同様に行なうことができる。例えば、前記のクローニング法において使用した培地と同じ組成の培地で培養してもよく、あるいはモノクローナル抗体を大量に得るためには、マウス腹腔内にハイブリドーマを注射し、腹水からモノクローナル抗体を採取することもできる。腹腔内に投与する場合には、事前(3~7日前)に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(プリスタン)等の鉱物油を投与しておく25と、より多量の腹水が得られる。この方法では、該ハイブリドーマと同系統のマウスの腹腔内に予め免疫抑制剤を注射し、T細胞を不活性化した後、 $10^6 \sim 10^7$ 個の該クローン細胞を血清を含まない培地中(0.5 ml)に浮遊させ、腹腔内に投与する。通常10~20日後に腹部が膨満し、腹水がたまったところで

マウスより腹水を採取する。この方法により、培養液中に比べて約100倍以上高い濃度のモノクローナル抗体が得られる。

上記方法により得られたモノクローナル抗体の精製方法は特に制限されるものではなく、例えば、Weir, D. M. : Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987) に記載されている方法で精製することができる。このうち代表的な方法を例示すれば、硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等が挙げられる。

- 10 これらの方法のうち、硫酸塩析法を1～6回、好ましくは3～6回繰り返すことによって、該モノクローナル抗体を精製することが可能である。しかしこの方法では精製されたモノクローナル抗体の収率が極めて低くなるという欠点がある。そのため、硫酸分画法を1～2回行うことによって得られる粗精製モノクローナル抗体について、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等から選ばれた少なくとも1種類、好ましくは2種類の
15 方法を行なうことによって、高純度に精製されたモノクローナル抗体を高収率で得ることができる。

- 硫酸塩析法と他法との組合せおよび順序としては、(1) 硫酸塩析法／イオン交換クロマトグラフィー法／ゲル濾過法、(2) 硫酸塩析法／イオン交換クロマトグラフィー法／アフィニティークロマトグラフィー法、(3) 硫酸塩析法／ゲル濾過法／アフィニティークロマトグラフィー法、等を用いることができる。
20

高純度かつ高収率にモノクローナル抗体を得るためには、上記の中でも(3)の組合せが特に適している。

- 上記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、液体窒素中または－80℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。
25

このようにして作製されるハイブリドーマの具体例としては、ハイブリドーマ HAAV-1G12、HAAV-1E9、HAAV-2H7、HAAV-2H9、HAAV-1G5、HAAV-3E7、HAAV-1E7として日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、ブタベスト条

約のもとでそれぞれ受託番号（括弧内は国内寄託の番号、以下同じ）：

FERM BP-5460 (FERM P-14764)；

FERM BP-5461 (FERM P-14765)；

FERM BP-5462 (FERM P-14766)；

5 FERM BP-5463 (FERM P-14767)；

FERM BP-5464 (FERM P-14768)；

FERM BP-5465 (FERM P-14769)；および

FERM BP-5466 (FERM P-14770)；

として、1995年2月15日付で国内寄託されたものから、1996年3月1

10 1日付で国際寄託に移管されたものが挙げられる。

以上に述べた本発明の方法によって製造される新規なモノクローナル抗体としては、アデノ随伴ウイルスCAPタンパク質の組換え体で免疫したマウスの脾臓リンパ球とマウスのミエローマ細胞を融合して作製したハイブリドーマ細胞株：

FERM BP-5460 (FERM P-14764)；

15 FERM BP-5461 (FERM P-14765)；

FERM BP-5462 (FERM P-14766)；

FERM BP-5463 (FERM P-14767)；

FERM BP-5464 (FERM P-14768)；

FERM BP-5465 (FERM P-14769)；および

20 FERM BP-5466 (FERM P-14770)；

が産生するモノクローナル抗体を挙げることができる。

またモノクローナル抗体を、それが特異的に認識する抗原の存在を検定するために、並びに、上記の抗原を精製するために用いることはよく知られている。例えば、当業者によく知られているイムノアッセイ技術やアフィニティークロマト
25 グラフィー技術などを使用して抗原の検出および精製を行うことができる。

イムノアッセイ技術に含まれる方法の一つとして、例えばサンドイッチイムノアッセイというのがある。これは、アデノウイルスCAPタンパク質に対するモノクローナル抗体を2つ使用する方法である。具体的には、先ず第1のモノクローナル抗体を固相支持体の表面に結合させておく。次いで、これに対して、抗原

の存在を検出するための試料を添加して抗原抗体反応を行わせ、抗原を（試料中に存在する場合）固相支持体上の第1のモノクローナル抗体に結合させる。適当な反応時間の経過後、洗浄して試料を除去し、第2のモノクローナル抗体を添加して反応させる。この第2のモノクローナル抗体は、第1のモノクローナル抗体が認識した抗原決定基とは異なる抗原決定基を認識してそれに結合する。適当な反応時間の経過後、洗浄して第2のモノクローナル抗体を除去してから、第2のモノクローナル抗体の存在の有無に関連した検出工程に進めば、試料中の抗原の存在の有無を検出することができる。例えば、第2のモノクローナル抗体に、発色反応を触媒する酵素を予め結合させておくことができ、この場合、上記したような第2のモノクローナル抗体と抗原との反応および洗浄後に、発色基質を添加することにより、抗原の存在の有無を発色の有無によって検出することができる。あるいはまた、第2の抗体は、アビジン-ビオチン系のような親和性を利用した方法によって検出に供されてもよい。

アフィニティークロマトグラフィーの方法も当業者によく知られている。典型的には、アデノ随伴ウイルスC A Pタンパク質に特異的なモノクローナル抗体を固相支持体に共有結合させて固定化させ、これをカラム管につめておく。このカラム管に精製すべき抗原を含む試料を注入すると、当該抗原は支持体上に固定化されている抗体に結合するが、他の物質は固定化抗体に結合できない。従って、カラムを適当な条件下で洗浄すれば、精製されるべき抗原のみがカラム中に残ることになる。その後、適当な溶出液をカラムに注入して抗原抗体の結合を弱めることによって抗原を溶出させ、精製された抗原を得ることができる。

より具体的には、例えば、ベクタープラスミドとパッケージングプラスミドをトランスフェクションすると同時にアデノウイルスをH e L a細胞などの適当な宿主に感染させた後、凍結融解を繰り返すことによって得た組換えA A Vとアデノウイルスを含む試料を上記のカラムに注入することによって、組換えA A Vのみを精製することができる。

以下において本発明を実施例により具体的に説明する。勿論、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例 1 (マウスの免疫、飼育および採血)

本実施例では以下の抗原を使用した。

WA 0 3 2 2 - 1 : アデノ随伴ウイルス C A P タンパク質の組換え体 (日本医科大学の島田隆教授より供与されたもの)

5 WA 0 3 2 2 - 2 (negative - 1) : アデノウイルス 5 型タンパク質 (日本医科大学の島田隆教授より供与されたもの)

WA 0 3 2 2 - 2 (negative - 2) : マウス血清タンパク質

WA 0 3 2 2 - 2 (negative - 3) : ウシ胎児血清タンパク質

WA 0 3 2 2 - 1 は免疫用およびスクリーニング用の抗原であり、WA 0 3 2
10 2 - 2 (negative - 1 から 3) は交差反応の有無の確認用の抗原である。

マウスの免疫、飼育および採血は以下の記載の通りに行った。

250 μ g の WA 0 3 2 2 - 1 を 0.5 ml の生理食塩水に懸濁し、この懸濁液を等容量の完全フロイントアジュバンド (FCA、DIFCO LABORATORIES) と十分に混和して、油中水型エマルジョンを調製した。これを B
15 ALB/c 系雌マウス (6 週齢、日本チャールス・リバー社) 5 匹に皮内投与 (抗原 50 μ g/匹) して初回免疫を行った。

初回免疫の 2 週間後に、125 μ g の WA 0 3 2 2 - 1 を 0.5 ml の生理食塩水に懸濁し、この懸濁液を等容量の不完全フロイントアジュバンド (FCA、DIFCO LABORATORIES) と十分に混和して、油中水型エマルジョンを調製し、上記のマ
20 ウスに皮内投与 (抗原 25 μ g/匹) して第 1 回目の追加免疫を行った。

上記の第 1 回目の追加免疫の 2 週間後に、上記の追加免疫と同様に、水中油型エマルジョンを調製し、皮内投与して第 2 回目の追加免疫を行った。

さらに、50 μ g の WA 0 3 2 2 - 1 を 0.5 ml の生理食塩水に懸濁したものを腹腔内投与して最終免疫を行った。最終免疫の 3 日後に、脾臓を摘出して細胞融合に用いた。
25

免疫期間中、マウスは、 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で、照明 12 時間 (蛍光灯による照明時間 : 午前 7 時 ~ 午後 7 時) および換気回数 15 回/時間に設定した飼育室でポリカーボネート製ケージに収容して飼育した。飼料は固型飼料 (CE-2、日本クリア株式会社) を、飲料水は次亜塩素酸ナトリウムを添加 (約 2 ppm) した井戸

水をいずれも自由に摂取させた。なお、ケージは1週間に2回交換し、飼育室は毎日洗浄した。動物の個体識別はサインペンで尾部をマークして行い、ケージの前面に試験名、性別、動物番号および免疫日程を明記したラベルを付けた。

- また、第1回目および第2回目の追加免疫の7日後に眼窩採血し、血清の抗体価を後の実施例3に記載するELISA法によって測定した。この結果は表1に記載されている通りであった。3回の免疫で5匹全てに高い抗体価が得られたが、27000倍希釈で最も高い吸光度を示したNo. 4のマウスの脾臓細胞を使用してハイブリドーマの作製を行った。

表1. マウス抗血清の抗体価

免疫 マウス個体No.	追加免疫(1)	追加免疫(2)	
	抗体価(希釈倍数)	抗体価(希釈倍数)	27000倍希釈での A_{492}
1	27000	81000	0.866
2	27000	81000	1.044
3	9000	27000	0.636
4	27000	81000	1.075
5	27000	27000	0.735

実施例2 (細胞融合およびクローニング)

- 実施例1のNo. 4のマウスをエーテル麻酔下、脇下静脈から採血し、血清をスクリーニング時の陽性対照として使用した。まず、マウスの脾臓を無菌的に摘出し、カナマイシン($400 \mu\text{g}/\text{ml}$)を含有するリン酸緩衝生理食塩水(PBS)および血清無添加RPMI 1640培地(三光純薬株式会社)で洗浄後、数箇所に割りを入れた。スライドガラスのフロスト部分を用いて押し出した脾臓細胞をTris- NH_4Cl 溶液で洗浄して赤血球を除去し、細胞融合用の脾臓細胞を調製した。

上記で得られた脾臓細胞とマウスミエローマ細胞 P 3 × 6 3 A g 8 U 1 (P 3 U 1) を 5 : 1 (脾臓細胞 : ミエローマ細胞) の割合で混合し、培地を十分に除去した後、1 ml の 5 0 % ポリエチレングリコール 4 0 0 0 (Sigma Chemical 社) 中で 3 7 °C で 2 分間インキュベートして細胞融合を行った。

- 5 この細胞を血清無添加 R P M I 1 6 4 0 培地で洗浄し、H A T (1×10^{-4} M のヒポキサンチン、 4×10^{-7} M のアミノプテリン、 1.6×10^{-5} M のチミジン、Sigma Chemical 社) 添加 1 0 % F B S (胎児ウシ血清、Bio Whittaker) の R P M I 1 6 4 0 培地 (H A T 培地) 中に浮遊させた。

- 10 この細胞を、9 6 ウェル培養プレート (6 5 5 1 8 0、Greiner Labortechnik) に 3×10^5 個 / ウェルずつ分注し、3 7 °C で 7 % C O₂ 下で培養した。融合処理の 3 日後に、H A T 培地を各ウェルへ 0. 1 ml ずつ添加し、さらに培養を続けた。

- 15 細胞融合の 7 日後に、培養上清の抗体価を、後述する実施例 3 の E L I S A 法によって測定して 1 次スクリーニングを行い、W A 0 3 2 2 - 1 にのみ反応したウェルの細胞を限界希釈法 (1 個 / ウェル) によって 1 次クローニングを行った。

- 20 その後、さらにスクリーニングおよびクローニングを繰り返して行い、モノクローンのハイブリドーマ 7 種類 (1 E 7、1 E 9、1 G 5、1 G 1 2、2 H 7、2 H 9 および 3 E 7) を得た。なお、クローニングに際しては、予め 3 7 °C、7 % C O₂ で一晩培養したマウス腹腔渗出細胞 (10^4 細胞 / ウェル) をフィーダー層として用いた。

実施例 3 (抗体価の測定)

- 25 マウス免疫期間中の血清抗体価の測定および培養上清のスクリーニングは以下に示した E L I S A 法に従って行った。E L I S A プレートへの固相化抗原として、W A 0 3 2 2 - 1 または W A 0 3 2 2 - 2 を使用した。陰性の対照としてミエローマ P 3 U 1 の培養上清または正常無処置マウス血清を、スクリーニング時の陽性対照として実施例 2 で採取した抗 W A 0 3 2 2 マウス血清を 2 0 0 0 0 倍あるいは 4 0 0 0 0 倍希釈して使用した。

ELISA法の操作手順:

(1) ELISAプレートの各ウェルへの抗原の吸着 (抗原の固相化)

96ウェル平底ELISA用プレート (FALCON3912、Becton Dickinson Labware) の各ウェルに、PBSで希釈したWA0322-1またはWA0322-2 ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) 溶液0.1mlを加え、4℃で一晩静置した。

(2) 洗浄

0.05% Tween 20含有PBS (Tween-PBS) で3回洗浄した。

(3) 非特異的吸着の阻止 (ブロッキング)

10 非特異的吸着を防止するために、0.5% BSA含有Tween-PBSを0.2mlずつ各ウェルに満たし、37℃で1時間放置した。

(4) 洗浄

Tween-PBSで3回洗浄した。

(5) 抗血清および培養上清との反応

15 0.1% BSA含有Tween-PBSにて希釈した1000倍から始まる3倍連続段階希釈抗血清、対照血清および培養上清を0.1ml/ウェル加えて、室温で2時間静置し、抗原抗体反応を行った。

(6) 洗浄

Tween-PBSで3回洗浄した。

20 (7) 酵素 (HRP) 標識抗マウスIgGウサギIgGの反応

0.1% BSA含有Tween-PBSで希釈した $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 酵素標識抗マウスIgGウサギIgG溶液0.1mlを各ウェルに加えて室温で1時間放置した。

(8) 洗浄

25 0.05% Tween 20-PBSで5回洗浄した。

(9) 酵素反応

発色液 (10mgのオルト-フェニレンジアミン、10mlの50mMリン酸水素2ナトリウム・24mMクエン酸緩衝液 (pH 5.0)、120 μl の1.7%過酸化水素溶液) 0.1mlを各ウェルに加えて、室温にて酵素反応を行っ

た。

(10) 酵素反応の停止

6 N 硫酸 0.05 ml を各ウェルに加えて、酵素反応を停止した。

(11) 吸光度の測定

- 5 酵素反応の停止後に、直ちに空気をブランクとして波長 492 nm での吸光度をマルチウェル用プレートリーダー (MODEL 2550 EIA READER、BIO-RAD) により測定した。

抗体価の判定：

- 抗血清の抗体価測定の際には、正常無処置血清を陰性対照として同時に測定し、
10 抗血清添加ウェルの吸光度が 0.35 以上を示す最高希釈倍率をその抗血清の抗体価とした。スクリーニングの際には、WA0322-1 に対しては、陽性対照と同等またはそれ以上の吸光度を示し、WA0322-2 に対しては反応しない培養上清をもつものを、抗体産生ハイブリドーマと判定した。

実施例 4 (産生モノクローナル抗体のサブクラスの決定)

- 15 作製したハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体のサブクラスは、実施例 3 の ELISA 法に準じて、Mouse Mono AB ID キット (HRP) (ZYMED) を使用して判定した。

- WA0322-1 を固相化した ELISA プレートにハイブリドーマの培養上清を反応させ、さらにマウスイムノグロブリンの各クラスおよびサブクラス (I
20 gG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgM、Igkappa および Iglambda) に対する特異抗体 (ウサギ) を反応させた。これに酵素標識抗ウサギ抗体を反応させた後、酵素反応を行って検出した。各サブクラスに特異的な抗体の代わりにウサギ正常無処理血清を陰性対照として同時に測定し、陰性対照の 2 倍以上の吸光度を示す場合を陽性とした。

- 25 得られた結果は表 2 に記載する。得られた抗体のうち、1E7、1E9、1G5、1G12 および 2H7 が IgG1、2H9 が IgG2a、そして 3E7 が IgM であった。

表2. 各モノクローナル抗体のクラスおよびサブクラス

抗体の種類	1E7	1E9	1G5	1G12	2H7	2H9	3E7
IgG1	11.4	5.49	4.10	6.14	4.67	1.13	1.01
IgG2 _a	0.93	1.51	1.31	1.53	1.48	11.4	1.02
IgG2 _b	0.73	0.77	0.79	1.00	1.13	1.46	1.17
IgG3	0.90	1.05	0.97	1.25	1.30	1.17	1.23
IgA	0.75	1.27	1.11	1.53	1.57	1.34	1.27
IgM	1.10	1.23	1.00	1.44	1.26	0.98	11.0
Ig kappa	11.4	5.70	3.54	5.20	4.88	11.4	9.93
Ig lambda	1.23	1.40	1.08	1.38	1.24	1.25	1.87
NRS*(A ₄₉₂)	0.176	0.182	0.217	0.154	0.157	0.175	0.181
評価	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2 _a	IgM

NRSを除く表内の数値は以下の通りである。

数値 = 各クラスおよびサブクラスに対する抗体を用いたウエルの吸光度/NRSを用いたウエルの吸光度
 * : non-immune rabbit serum (陰性対照)

実施例 5 (ハイブリドーマ培養上清のWA0322-1およびWA0322-2
に対する反応性)

実施例 3 に記載の E L I S A 法を使用して、各培養上清の反応性を調べた。W
A 0 3 2 2 - 1 および W A 0 3 2 2 - 2 を固相化したプレートを用い、陰性対照
5 として P 3 U 1 の培養上清を用いた。

得られた結果は図 1 および図 2 に示されている。得られた 7 種類の抗体全てが、
W A 0 3 2 2 - 1 にのみ反応し、W A 0 3 2 2 - 2 とは反応しなかった。この結
果から、得られた抗体は全て、W A 0 3 2 2 - 1 に特異的に反応することが示さ
れる。

10 産業上の利用可能性

以上の説明より理解されるように、本発明のモノクローナル抗体は、アデノ随
伴ウイルス C A P タンパク質と高い反応性を有する。

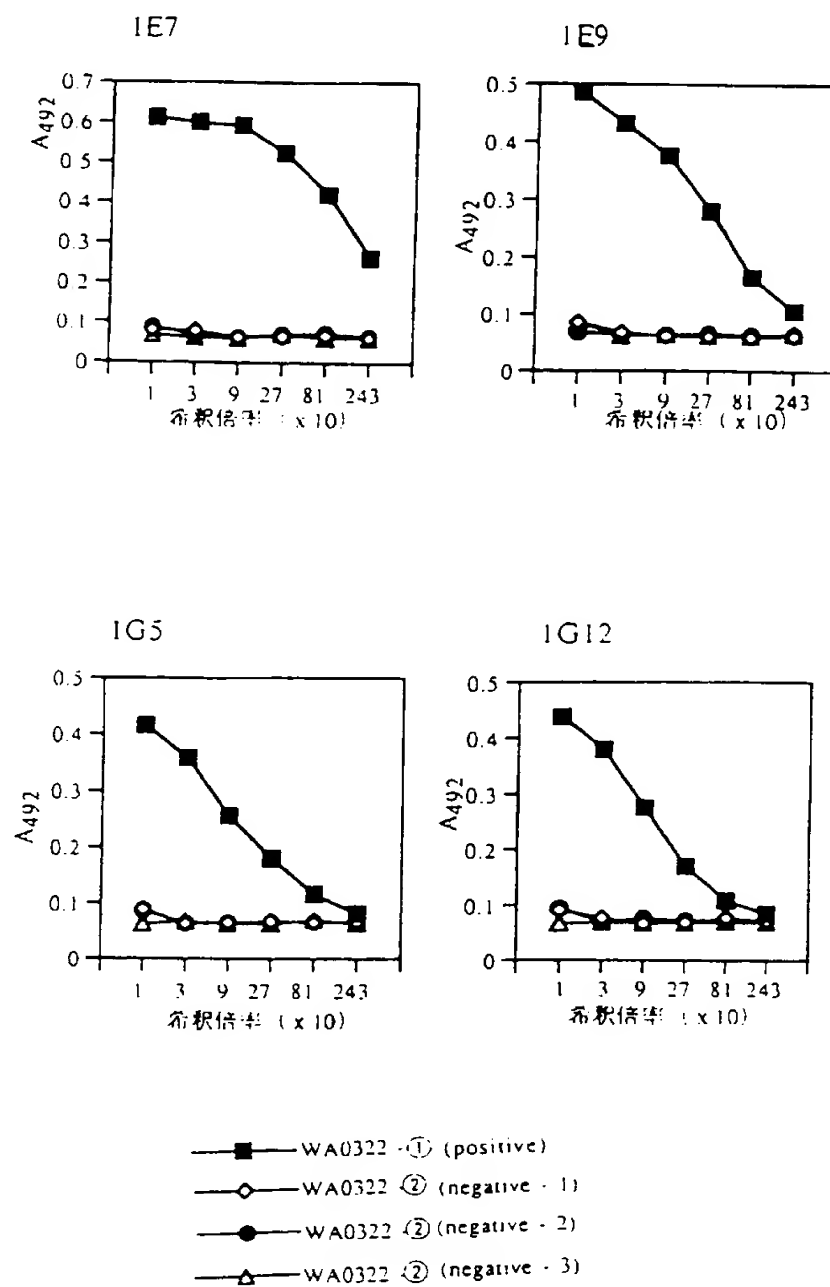
したがって、本発明により提供されるモノクローナル抗体がアデノ随伴ウイル
スおよび組換えアデノ随伴ウイルスベクターを特異的に認識し得るという特性を
15 有することを利用して、この新規なモノクローナル抗体を以下のように応用す
ることが可能である。すなわちこのモノクローナル抗体は、アデノ随伴ウイルスの
検出、遺伝子治療用組換えアデノ随伴ウイルスベクターの精製への応用が可能で
ある。

しかも、このアデノ随伴ウイルス C A P タンパク質に対するモノクローナル抗
20 体を特異的に産生するハイブリドーマ細胞株の樹立により、該モノクローナル抗
体を多量に、かつ容易に得ることが可能となる。

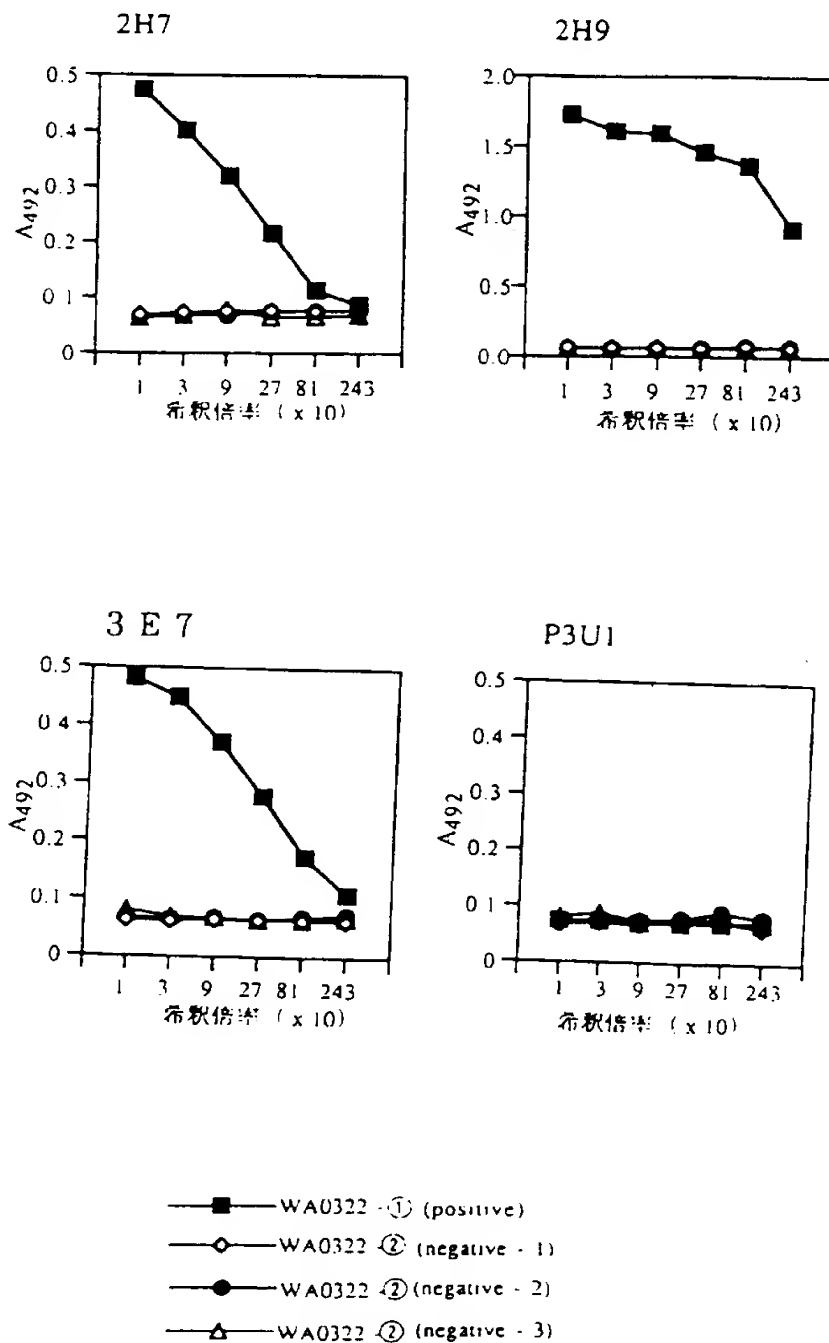
請求の範囲

1. 抗原としてアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質またはアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質の組換え体で免疫した哺乳動物より調製したリンパ球と、ミエローマ細胞株とを融合したハイブリドーマから産生されてなることを特徴とするアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体。
5
2. 請求項1記載のアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞株。
3. 請求項1記載のアデノ随伴ウイルスCAPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を利用することを特徴とする、アデノ随伴ウイルスの検出
10 方法および遺伝子治療用組換えアデノ随伴ウイルスベクターの精製方法。

第1図



第 2 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K16/08, C12N5/20, C12N15/06, C12N15/64, C12N15/86,
C12P21/08, G01N33/569, G01N33/577 // (C12P21/08, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12P21/00, C12P21/02, C12P21/08, C12N15/02-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Trempe, J.P. et al. "Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein", J. Virol. (1988) Vol. 62, No. 9, p. 3356-3363	1 - 3
Y	Cassinotti, P. et al. "Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1", Virology (1988) Vol. 167, No. 1, p. 176-184	1 - 3
Y	Hunter, L.A. et al. "Colocalization of adeno-associated virus rep and capsid proteins in the nuclei of infected cells", J. Virol. (1992) Vol. 66, No. 1, p. 317-324	1 - 3
P,X	Wistuba, A. et al. "Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing rep and cap proteins", J. Virol. (9. 1995) Vol. 69, No. 9, p. 5311-5319	1 - 3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 5, 1996 (05. 06. 96)

Date of mailing of the international search report

June 18, 1996 (18. 06. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁶ C07K 16/08, C12N 5/20, C12N 15/06, C12N 15/64, C12N 15/86, C12P 21/08, G01N 33/569, G01N 33/577 // (C12P 21/08, C12R 1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁶ C12P 21/00, C12P 21/02, C12P 21/08, C12N 15/02 - 15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Trempe, J. P. et al. "Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein", J. Virol. (1988) 第62巻, 第9号, p. 3356-3363	1-3
Y	Cassinotti, P. et al. "Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1", Virology (1988) 第167巻, 第1号, p. 176-184	1-3
Y	Hunter, L. A. et al. "Colocalization of adeno-associated virus rep and capsid proteins in the nuclei of infected cells", J. Virol. (1992) 第66巻, 第1号, p. 317-324	1-3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.06.96

国際調査報告の発送日

18.06.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐伯 裕子

4 B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Wistuba, A. et al. "Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing rep and cap proteins", J. Virol. (9.1995) 第69巻, 第9号, p. 5311-5319	1-3